

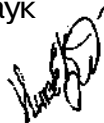
НИКИТИНА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

ТОКСИКОЛОГО - МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕШЛАМА - ОТХОДА
НЕФТЕХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

03.00.07-Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на **соискание** ученой степени
кандидата биологических наук



Казань - 2003

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И.Ульянова-Ленина

Научный руководитель: Доктор биологических наук,
профессор Р.П. Наумова

Официальные оппоненты: Член корр. РАН,
Доктор
биологических наук И.Б. Ившина

Доктор биологических наук,
профессор Л. П. Хохлова

Ведущая организация: Казанский Институт биохимии и
биофизики КНЦ РАН

Защита состоится « **2** » **октября** 2003г. в _____ на заседании
диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском
государственном университете им. В.И.Ульянова-Ленина, 420008,
г.Казань, ул. Кремлёвская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан _____ августа 2003г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
кандидат биологических наук



А.Н. Аскарова

Актуальность проблемы. Мировое сообщество движется в направлении повышения уровня урбанизации и роста промышленного производства, в связи с чем, одна из главных международных экологических проблем связана с наличием в объектах биосферы сложных комплексов экологически опасных ксенобиотиков, которые представляют угрозу для почвы, воздуха, водоемов, источников питьевой воды, здоровья людей.

В нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленных отраслях остро стоит проблема обезвреживания и утилизации больших объемов **нефтеcодержащих** отходов (Shailubhai, 1984; Castaldi, Ford, 1991; Giles et al., 2001; Mishra et al., 2001; Vasudevan, Rajaram, 2001; Saikia et al., 2001). Это в полной мере относится к производственному объединению «Нижнекамскнефтехим» (НКНХ) (г.Нижнекамск, Россия), функционирование которого сопряжено с постоянным образованием твердых **нефтеcодержащих** отходов. До недавнего времени в мировом масштабе наиболее распространенной была практика захоронения твердых опасных отходов на специализированных полигонах (Mueller et al., 1984; Holmboe, 1993; Saxena, Jotshi, 1997). Аналогично решалась эта проблема в НКНХ, где, начиная с 1965г, происходило накопление этих шламов в шламонакопителях. В настоящее время объемы скопившихся в этих специальных депо отходов достигают 1123 тыс м³. Существующие депо практически заполнены, а строительство новых противоречит экологическим критериям. В этих условиях возникла необходимость освобождения **шламонакопителей** и поиска путей обезвреживания и утилизации твердых нефтехимических отходов.

Нефтешламы содержат устойчивые и токсичные компоненты, в частности, полициклические ароматические **углеводороды** (ПАУ), **алканы** (Aprill et al., 1990; Rocha et al., 1997; Giles et al., 2001; Mishra et al., 2001), а также могут включать специфические продукты нефтехимии (Якушева с соавт., 2002). Часть нефтехимических составляющих - это токсиканты и канцерогены (Styrene, 1983; McMichael, 1988). Химический состав шламов варьирует в зависимости от их происхождения, специфики применяемых на предприятиях технологий добычи, переработки и химического синтеза. Исходя из этого, в каждом конкретном случае необходимо создавать стратегию **ремедиации** с учетом биологических и абиотических особенностей, которые характеризуют исследуемые твердые **отходы**.

Научное обоснование стратегии ремедиации предполагает создание концепции химического, токсикологического и биологического статуса данной антропогенной экосистемы. К изучению первых двух аспектов привлечено внимание ряда **научно-**

исследовательских центров (April et al., 1990; Juvonen et al., 2000; Giles et al., 2001), по поводу последнего практически нет данных литературы.

Наличие и степень микробной контаминации нефтешламов важны с позиций эволюции биоценозов в процессе многолетней аккумуляции специфического комплекса ксенобиотиков. Литература по нефтешламам затрагивает, как правило, микробиологические аспекты биоремедиации (Lazar et al., 1999; Giles et al., 2001; Mishra et al., 2001; Vasudevan, Rajaram, 2001), но не собственно нефтешламов как концентрированного комплекса специфических загрязнителей. Вместе с тем, создание биотехнологии, направленной на детоксикацию и утилизацию нефтешлама, предполагает исследование микробиологического статуса этой антропогенной экосистемы, что и определило изучение закономерностей распределения ряда физиолого-таксономических групп микроорганизмов в промышленном накопителе нефтехимических отходов, особенностей их физиологического состояния с учетом специфики среды обитания.

Выживание и функционирование живых организмов в условиях сложной комбинации экстремальных факторов - проблема общебиологического масштаба. Дискуссии по вопросам, связанным с гипометаболическим, анабиотическим, жизнеспособным-но-некультивируемым, "другим состоянием" микробных популяций и сообществ (Kaprelyants et al., 1993; Atlas, Bartha, 1997; Trevors, 1998; Головлев, 1998; Mascher et al., 2000) свидетельствуют о сложности данной проблемы. Её исследование включает закономерности адаптации микроорганизмов в условиях сложного комплекса экстремальных факторов нефтешлама: токсичности, гидрофобности и низкой биодоступности ксенобиотиков, высокого осмотического давления, сезонных колебаний температур.

Мировой опыт по переработке твердых отходов демонстрирует наибольшую экономическую эффективность и экологическую безопасность применения биотехнологий, однако известны лишь немногочисленные примеры экспериментального и промышленного обезвреживания шламов с высоким содержанием нефтяных углеводородов с помощью такого распространенного приема биоремедиации как компостирование (O'Reilly, Simpkin, 1997; Kirchmann, Ewnetu, 1998; Lazar et al., 1999; Juvonen et al., 2000; Admon et al., 2001). При этом большинство работ сконцентрировано на исследованиях химических аспектов ремедиации нефтесодержащих отходов (El-Nawawy et al., 1992; Prado-Jatar et al., 1993; O'Reilly, Simpkin, 1997; Kirchmann, Ewnetu, 1998). В связи с ужесточением норм сброса в окружающую среду различных экологически опасных химических отходов возникла

необходимость в процессе обезвреживания **нефте**содержащих осадков, наряду с химическим мониторингом, осуществлять, токсикологические исследования (Aprillet al., 1990; Juvonen et al., 2000) в сочетании с выявлением закономерностей формирования и функционирования микробных сообществ в условиях компостирования **неф**тагрязненных шламов (Vasudevan, Rajaram, 2001; Petrisor et al., 2001).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - создать научную основу эффективной биотехнологии **детоксикации** и утилизации сложного комплекса экологически опасных отходов нефтехимического предприятия. Были поставлены следующие **задачи**:

- Охарактеризовать исходный **неф**тешлам по химическим, токсикологическим и микробиологическим показателям;
- Выявить закономерности распределения ряда **физиолого-таксономических** групп микроорганизмов в промышленном накопителе нефтехимических отходов, а также оценить особенности их физиологического состояния с учетом специфики среды обитания;
- Оценить особенности метаболического потенциала микроорганизмов **неф**тешлама с позиции создаваемой биотехнологии;
- Осуществить **пилотно-полевое** компостирование на базе производственного объединения "**Ни**жнекамск**неф**техим" и оценить эффективность компостирования путем мониторинга с использованием основных химических, токсикологических и микробиологических параметров;
- Разработать рекомендации по практической реализации полномасштабной **ремедиации** нефтехимических отходов.

Научная новизна. Впервые дана характеристика химического состава, микробиологического статуса и токсикологических свойств твердых нефтехимических отходов. Выявлены закономерности пространственно-временного распределения основных **физиолого-таксономических** групп микроорганизмов в многотонной массе нефтехимических отходов с учетом принципиально важной доли их жизнеспособных форм. Новым является также аспект дифференцированной оценки стратегии адаптации различных физиологических групп микроорганизмов в условиях длительного воздействия комбинации экстремальных факторов. Предложена гипотеза эволюции микробного сообщества исследуемой антропогенной экосистемы.

Дана сравнительная характеристика контаминации нефтешламов с позиций численности и метаболической активности деструкторов основных устойчивых,

токсичных и мутагенных органических ксенобиотиков из би- и трициклоаренов, тиюфенов, алканов.

Проведено разностороннее исследование токсических и генотоксических эффектов: острая и отдаленная токсичность в тестах на беспозвоночных, **токсичность** по отношению к бактериям, **фитотоксичность**, мутагенность в тесте Эймса. •

Практическая значимость. Результаты диссертационной работы позволили практически реализовать в **пилотно-полевых** условиях (совместно с "Нижнекамскнефтехим") компостирование для обезвреживания и утилизации твердого отхода нефтехимических отходов производственного объединения "Нижнекамскнефтехим" на территории Биологических очистных сооружений и с привлечением материальной базы этого предприятия. Выявление высокой потенциальной метаболической активности микрофлоры нефтешлама позволило осуществить **ремедиацию** без интродукции бактериальных штаммов, что значительно удешевляет процесс. Применение испытанной технологии позволило уменьшить в среднем на 90% содержание нефтяных углеводородов, в том числе и полициклических ароматических углеводородов, с одновременной **детоксикацией** в отношении бактерий, одноклеточных организмов и растений. Создана система токсиколого-микробиологического и химического мониторинга, включающая тестирование различных физиолого-биохимических групп микроорганизмов и биологических активностей и изменение химического состава в процессе детоксикации и минерализации сложного комплекса промышленных отходов.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены на: V и VI международных конференциях "Environmental contamination on central and eastern Europe" (Prague, 1999, 2003); VII Международном симпозиуме **In-Situ and On-Site Bioremediation** (Орландо, США); V международной конференции "Environmental pollution – ICEP-2001", (Volgograd-Pem, 2001); V, VI и VII **Пушинских** конференциях молодых ученых "Биология - наука 21 века" (Пушино, 2001, 2002, 2003); II научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов **научно-образовательного центра** Казанского гос. университета (Казань, 2001). Основные результаты диссертации обсуждены на ежегодных дискуссиях партнеров в рамках проекта Европейского сообщества "**Copernicus-2**" (Вагенинген, Голландия), 2002 (Флоренция, Италия), 2002 (Казань, Россия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи, 11 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, изложение результатов исследований и их обсуждение, выводы и перечень цитируемой литературы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц и 33 рисунка. Цитируемая литература включает 211 источников, из них 182 иностранных.

Материалы и методы

Отбор проб нефтешлама и компостов Пробы изучаемого исходного нефтешлама - отхода нефтехимического производства НКНХ, отбирали из шламонакопителя, расположенного на территории биологических очистных сооружений этого предприятия. Образцы нефтешлама были отобраны из разных глубин (0,2, 1 и 3м) с помощью трех вертикальных скважин пробоотборником, обеспечивающим отбор проб из разных горизонтов без перемешивания слоев. Химические и токсикологические анализы проводили в течение 7-14 дней после отбора проб, которые хранили в закрытых полиэтиленовых ёмкостях при 4°C, герметизированных парафином. Микробиологические анализы выполнялись непосредственно после извлечения проб.

Экспериментальное компостирование в полевых условиях. На территории биологических очистных сооружений НКНХ в июне 1999 г были заложены 3 варианта **компостирования**: 1. К (контроль) - шлам + минеральные удобрения в виде нитроаммофоски (NPK); 2. ДТ - шлам + NPK + углеводородный компонент в виде дизельной фракции нефти (ДТ); 3. ОПЛ - шлам + NPK + твердый отход производства **лапрола** (ОПЛ), состоящий на 30% из бентонита, на 40% - из KH_2PO_4 и на 30% - из полиэфиров.

Микробиологические методы анализа. Прямой микроскопический учет микробных клеток проводили в соответствии с (Методы..., 1991). Жизнеспособность микроорганизмов определяли в тесте Когуре (Kogure et al., 1979). Численность культивируемой части микроорганизмов нефтешлама определяли с помощью посева методом серийных разведений. Учет общего количества аэробных **гетеротрофов** вели на **мясопептонном** агаре (МПА). При определении доли гипометаболических форм учитывали динамику появления колоний на МПА, согласно Кожевину (1989). Для этой цели время культивирования на **агаризованных** средах было увеличено до 8-11 суток.

Количество микромицетов учитывали на подкисленной среде Чапека, **актиномицетов** - на **крахмало-аммиачном** агаре, **спорообразующих** микроорганизмов - на сусло-агаре, после предварительной пастеризации, денитрифицирующих бактерий - на среде Гильея, **сульфатвосстанавливающих** - на среде Постгейта В (Manual..., 1983).

Для учета числа микроорганизмов-деструкторов компонентов нефтешлама использовали **агаризованный** нефтешлам после его предварительного разбавления стерильным 0.05 М **K-Na** фосфатным буфером (pH 7.0) с таким расчетом, чтобы общее содержание органических веществ было соизмеримо с таковым в мясопептонном бульоне. Это достигалось шестикратным разбавлением исходного нефтешлама при

уровне его влажности 60%*. Учет числа микроорганизмов-деструкторов индивидуальных ксенобиотиков в нефтешламе проводили с использованием метода серийных разведений шлама и плотных питательных сред на основе среды следующего состава (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.25, KH_2PO_4 - 3.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 4.5, дрожжевой экстракт - 0.05, агар 20.0, pH 7.0. В качестве источника углерода вносили один из ксенобиотиков: **фенантрен**, антрацен, флуорен, гексадекан (по 400 мг/л), **дибензотиофен**, бифенил (по 200 мг/л), октан и нафталин (в парах).

Методы химического анализа. Содержание аммонийного, нитратного, нитритного азота, фосфат-ионов определяли по (Лурье, 1984). Определение суммы органических веществ проводили по ГОСТ 26213-91. Летучие компоненты **нефтешлама** определяли по методу, описанному (Лурье, 1984). **Хлороформ-экстрагируемые** вещества (нефтяных углеводородов) оценивали гравиметрически и **ИК-спектроскопией** после экстракции в аппарате **Сокслета**. Для определения мальтенов (**гексан-растворимые** компоненты) и асфальтенов (**гексан-нерастворимые** компоненты) хлороформный экстракт переэкстрагировали гексаном. Осадок **асфальтено-смолистых** соединений (**гексан-нерастворимых**) отделяли от мальтенов центрифугированием, промывали гексаном, и повторно центрифугировали, сушили и взвешивали. Определение **ПАУ** проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографией на приборе серии LPc UV-VIS детектором, на колонке с обращенной фазой (5тм, 4.6 CC 250 мм, **Ultracarb 50DS**, Phenomenex, USA).

Токсикологические методы. Токсичность водного **экстракта** нефтешлама и компостов по отношению к микроорганизмам определяли в тесте со штаммом *Pseudomonas putida* no ISO 10712 (ISO, 1995), острой токсичности - в тесте с *Paramecium caudatum* (Selivanovskaya et al., 1997). Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса) осуществляли по методике Ильинской с соавторами (1995). **Фитотоксичность** нефтешлама (компостов) определяли на растениях из класса двудольных (редис *Raphanus sativus radiculata*) и однодольных (пшеница *Triticum aestivum*). Навеску нефтешлама или компоста шлама (5г) распределяли на чашке Петри, накрывали фильтровальной бумагой соответствующего диаметра, добавляли 5 мл стерильной водопроводной воды, раскладывали 10 семян одного из растений, заранее

*культивирование на обводненном агаризованном нефтешламе разработано Галиевым Р.А.

пропорошенных, измеряли начальную длину корней, рассчитывали среднюю длину ($L_{нач}$). Через сутки измеряли длину корней, рассчитывали среднюю ($L_{конеч}$). Токсичность рассчитывали по формуле:

$$T = \frac{(L_{конеч} - L_{нач})_{опыт}}{(L_{нач} - L_{конеч})_{контр}} \times 100\%$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика отхода нефтехимического производства

1.1. Химико-токсикологические свойства нефтешлама

В изучаемом нефтехимическом шламе 20-25% от органического вещества составляют компоненты нефти (табл. 1), что характерно для данной категории нефтесодержащих отходов (Bartha, Bossert, 1984; Castaldi, Ford, 1992). В составе нефтяных углеводородов преобладает фракция **мальтенов**, более чем в 10 раз меньше **асфальтенов**, кроме того, присутствуют продукты и полупродукты нефтехимического производства: бензолы, **толуолы**, ксилолы, **стиролы**, часть из которых являются токсикантами и канцерогенами (McMichael, 1987; Styrene, 1983). Наличие таких продуктов является характерным именно для отходов нефтехимического синтеза (Castaldi, Ford, 1992; Якушева, Наймова, 1998).

К экологически опасным загрязнениям принадлежат многие характерные нефтяные компоненты **шламов**, в том числе ПАУ (Menzie et al., 1992). Концентрация 13 ПАУ (нафталина, **ацетонафтилена**, бифенила, флуорена, **фенантре-на**, антрацена, флуорантена, пирена, **1,2-бензофлуорантена**, хризена, бензо(а)пирена, **дибензо(х)антрацена**) в нефтешламе НКНХ сравнимас таковой в отходах нефтепереработки (Aprill et al., 1990), которые характеризуются как токсичные и экологически опасные. Кроме того, в нефтешламе НКНХ содержится особо контролируемый **бензо(а)пирен**, который в России не нормируется для отходов, а для почвы его ПДК составляет 0.02 мг/кг (Санит. нормы..., 1988). Оценивая перспективы переработки и утилизации изучаемого шлама, с учетом приведенных норм и фактического содержания бензо(а)пирена (12-47 мг/кг), этот компонент следует контролировать особо в процессе предстоящей обработки.

С точки зрения последующей ремедиации отходов нефтехимической **промышленности**, его важной составляющей являются минеральные компоненты и их сбалансированность для развития и активной жизнедеятельности микроорганизмов.

Химико-токсикологическая характеристика нефтешлама НКНХ

Химические параметры		Кон-ция
Органические вещества, г/кг		432 - 532
Углеводороды нефти, г/кг (гравиметрически)		102 - 149
Летучие углеводороды, г/кг		14 - 32
Мальтены, г/кг		95 - 139
Асфальтены, г/кг		6 - 10
Сумма 13 определенных ПАУ, г/кг		5 - 8
Азот		
	Аммонийный, мгN/кг	49 - 245
	Нитратный, мгN/кг	6-11
	Нитритный, мгN/кг	1 - 8
Общий фосфор, мгP/кг		1-2
Сульфиды, мгS/кг		3 - 13
pH		7.8-8
Токсикологическая оценка		
Токсичность по отношению к <i>Ps. putida</i> , % ингибирования роста		- 18 - -28
Острая токсичность на <i>P. caudatum</i> , % смертности		58 - 74
Фитотоксичность нефтешлама, % ингибирования роста корней:		
	Пшеница	95 - 100
	Редис	96 - 100
Мутагенность на <i>Salmonella typhimurium</i> , кратность превышения над контролем:		
Вод. экстракт (с фракцией S9)		
	TA98	9 - 10
	TA100	9-15
Органич. экстракт (с фракцией S9)		
	TA98	6-7
	TA100	5-6

Согласно проведенным ранее исследованиям, оптимальные соотношения **C:N** и **C:P** для биоремедиации нефтешлама составляли 60:1 и 800:1, соответственно (Dibble, Bartha, 1979). В исследуемом нами отходе эти отношения были 1800:1 и 31000:1 (табл. 1), соответственно, что свидетельствует о дефиците азота и особенно фосфора для жизнедеятельности микроорганизмов, что было учтено при переработке нефтешлама с применением биологической технологии.

Экологическая опасность нефтешламов подтверждена при анализе токсичности. Выявлено высокое негативное воздействие на простейшие и растения, а также

показана мутагенность водных и органических экстрактов шлама (тест Эймса), возрастающая в 2-3 раза в присутствии метаболической активации (фракции S9) (табл. 1). Данные литературы по поводу токсического потенциала исходного нефтешлама отсутствуют, однако, ранее была обнаружена высокая токсичность и генотоксичность нефтешламо-загрязненных почв (Aprill et al., 1990) и компостов (Juvonen et al., 2000). Выявленный химический состав в сочетании с экотоксикологической оценкой шламов производственного объединения "Нижнекамскнефтехим" позволяет отнести их к экологически опасным отходам, которые требуют предварительного обезвреживания.

1.2 Микробиологический статус нефтешлама

Большинство известных работ посвящены ремедиации шламов нефтедобычи (Giles et al., 2001; Габбасова соавт., 2001) и нефтепереработки (Aprill et al., 1990; Rocha et al., 1997). В этих работах основной акцент делается на химико-токсикологических аспектах проблемы. Исключение составляют работы румынских (Petrisor et al., 2001) и индийских исследователей (Mishra et al., 2001; Vasudevan, Rajaram, 2001), однако, и в них анализ микробного сообщества ограничивается аэробными гетеротрофами и нефте-деструкторами.

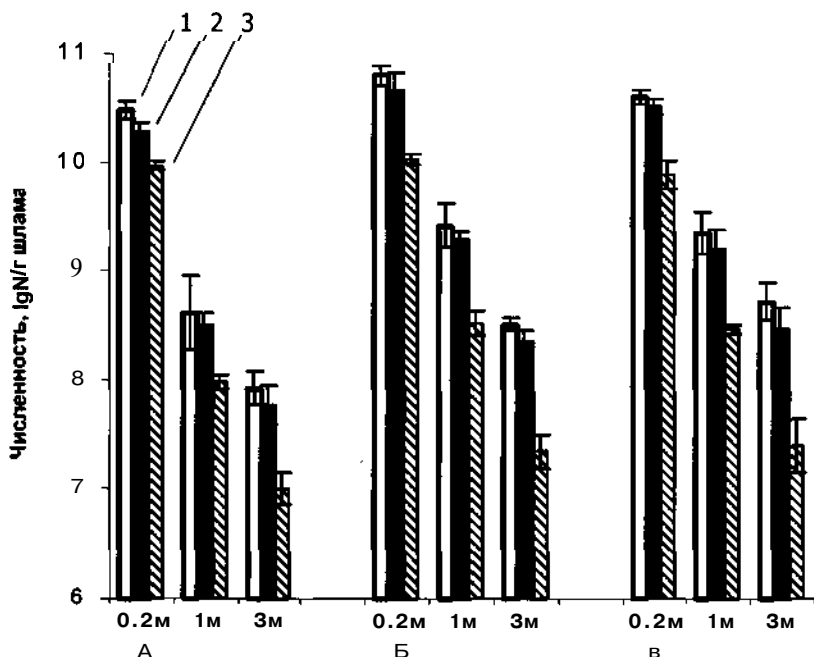


Рис. 1. Общая количественная характеристика микрофлоры нефтешлама. 1 - общее содержание микробных клеток, 2 - количество жизнеспособных клеток, 3 - количество аэробных гетеротрофов. А, Б и В - участки шламонакопителя.

Стратегия же **ремедиации нефтешлама зависит** от **совокупности** представлений о количестве, физиологическом статусе и метаболической активности населяющих его микроорганизмов. Принимая во внимание многолетнюю историю депонирования побочных продуктов нефтехимии, мы предприняли экспериментальное бурение **В** трех репрезентативных участках изучаемого **шламонакопителя** (А, Б и В). Это позволило оценить толщину создавшегося депо шлама (в среднем около 3 м) и асептически отобрать пробы из его отдельных горизонтов.

Неожиданным и наиболее значимым оказался факт высокой микробной обсемененное™ толщи нефтешлама, хотя во всех случаях проявлялась тенденция к снижению показателей численности с глубиной залегания соответствующих горизонтов (рис. 1). **С точки** зрения впервые проведенного нами исследования пространственного распределения и физиологического состояния микроорганизмов в многотонной массе нефтехимических отходов большой интерес представляет высокая доля жизнеспособных форм этих организмов (до 90%).

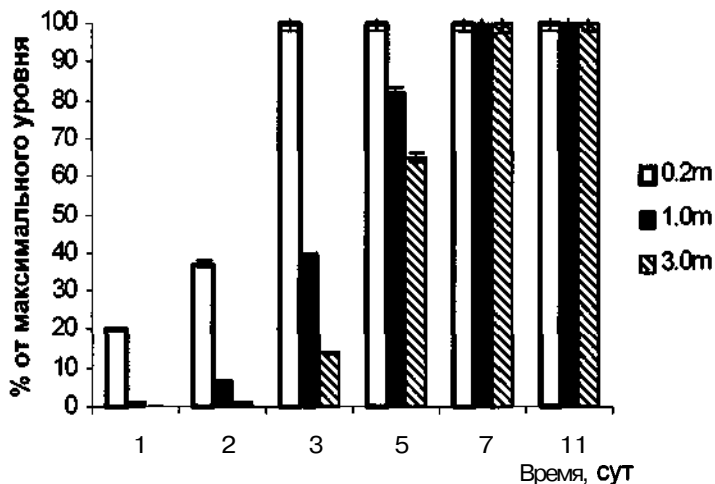


Рис. 2. Последовательность появления колоний аэробных гетеротрофов (в процентах от максимального уровня) в зависимости от глубины горизонта

Наблюдение за динамикой роста гетеротрофов после посева проб нефтешлама (сразу же после их асептического извлечения из накопителя) выявило важную особенность большинства микроорганизмов, населяющих толщу нефтешлама, а именно, запаздывающее (на 5-7 суток) появление и медленный последующий рост их колоний на **агаризованных** средах (рис.2), что позволяет оценить состояние этих микроорганизмов как гипометаболическое. Об обратимости этого состояния, по крайней мере, узначительной части **изолятов, свидетельствует то**, что, будучи выделены из медленно растущих колоний, они ускоряли темпы роста после 2-3 пассажей на средах, способных поддерживать их рост.

С учетом изложенного, наиболее вероятным представляется следующий ход эволюции микробных сообществ нефтешлама. Микроорганизмы могли активно размножаться в верхнем горизонте после очередного сброса отходов, то есть в условиях высокой концентрации доступных компонентов нефтешлама, достаточной аэрации на границе раздела шлам-воздух и увлажнения за счет атмосферных осадков. В результате последующего наслоения очередных порций шламовых масс экологическая ситуация в погребенном под ними слое резко ухудшалась, прежде всего в отношении кислородного, водного, осмотического и температурного режимов. Поэтому микробный статус "зрелого" шлама определяется способностью микроорганизмов к длительному (в течение десятилетий) выживанию в его толще, в условиях сложного комплекса экстремальных факторов. Рассмотренные выше данные свидетельствуют о наличии такой способности у большого количества микроорганизмов, включая обитателей самого нижнего горизонта шлама, возраст которого оценивается в 35-40 лет. Помимо аэробных гетеротрофов, анализ нефтешлама выявил в его толще высокий уровень различных групп микроорганизмов, в том числе **спорообразующих бактерий, актиномицетов и микромицетов** (рис. 3).

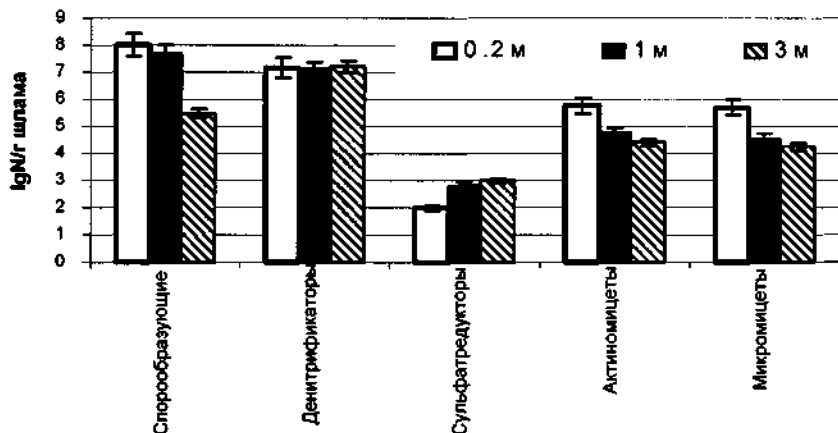


Рис. 3. Распределение основных физиолого-таксономических групп бактерий по горизонтам.

Минеральный азот нефтешлама находится в основном в аммонийной форме, что свидетельствует о блокировании нитрификации на первом, аэробном этапе трансформации шламовых масс после их поступления в накопитель. Это, в свою очередь, означает невозможность реализации потенциала денитрификаторов, несмотря на сравнительно высокий уровень их адаптации в условиях нефтешлама (рис.3).

Хотя бескислородные условия подповерхностных слоев благоприятны для **сульфатредукции** и данная группа бактерий представлена в нефтешламе (рис. 3), **сульфидогенез** невозможен и из-за низкого содержания сульфатов (на уровне 3-12 мг/кг), и из-за отсутствия условий для функционирования пищевой цепи (включающей

и аэробов, и анаэробныхацидо/ацетогенных бактерий), ответственной за регенерацию доступных органических субстратов. Последнее подтверждается характером жирных кислот (C5 - C16), обнаруженных в нефтешламе, а именно отсутствием низших гомологов этого ряда (Якушева с соавт., 2002). Таким образом, гипометаболическое состояние большей части микроорганизмов нефтешлама обусловлено неблагоприятными физическими факторами (гидрофобное окружение, аноксия), и/или отсутствием доступных питательных субстратов и альтернативных акцепторов электронов.

Сопоставимость величин КОЕ при посеве разведений проб **нативного** нефтешлама как на МПА, так и на **агаризованный** нефтешлам (рис. 4), свидетельствует о том, что многолетнее пребывание микроорганизмов в толще нефтехимических отходов не исключает возможности не только их выживания, но и сохранения разносторонней метаболической активности. Речь **идет** об утилизации как легкодоступных субстратов, так и специфических компонентов изучаемых отходов. **ПАУ**, входящие в состав тяжелой нефтяной фракции, в отличие от водорастворимых компонентов нефтехимических отходов, не подвергаются окислению в условиях биологической очистки сточных вод (Якушева, Наумова, 1998), и поэтому являются предметом особой озабоченности из-за устойчивости, мутагенности и канцерогенное™ многих из них (Menzie et al., 1992). Проведенный в этой связи скрининг микроорганизмов-деструкторов выявил их высокую активность в отношении компонентов нефтешлама, как алканов, так и некоторых соединений из класса ПАУ.

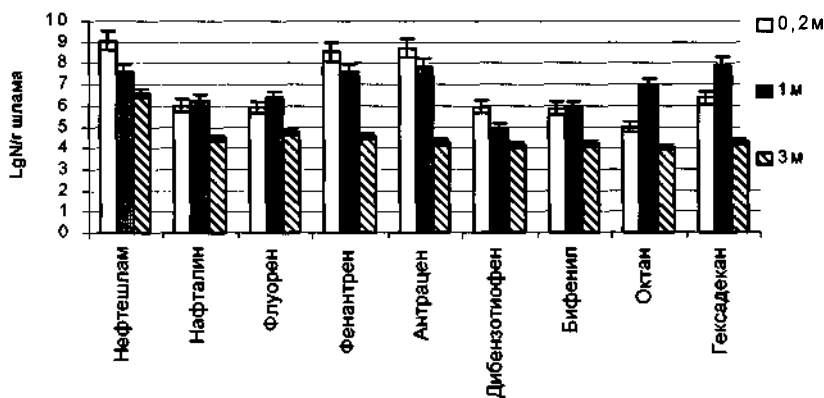


Рис. 4. Распределение деструкторов нефтешлама и индивидуальных ксенобиотиков в различных слоях нефтешлама.

Наличие адекватного метаболического потенциала в сочетании с широкими адаптивными возможностями микроорганизмов, населяющих нефтешлам, означает отсутствие необходимости в дополнительной биоаугментации в условиях создаваемой нами технологии **ремедиации** отходов нефтехимии.

1. Биоремедиация нефтехимического шлама

2.1. Химический мониторинг компостирования

После завершения цикла исследований по установлению химико-токсикологического и микробиологического статуса **нефтешлама** объединения НКНХ был изучен и решен вопрос о моделировании **биоремедиации** этого отхода в **опытно-полевых** условиях.

Мониторинг химических показателей в процессе опытно полевого компостирования шлама НКНХ выявил период продолжительностью 4 месяца, в течение которого наблюдалась высокая скорость элиминации нефтяного загрязнения из компоста, в среднем на 70-80%. Наибольшая скорость деструкции нефтяных углеводородов, в том числе **ПАУ**, зафиксирована в контрольном варианте. Высокая скорость деградации загрязнений, по-видимому, является следствием исходно высокой **обсемененности** шлама, наличия в составе микробного сообщества высоко активной специализированной микрофлоры, а также внесения N и P. Максимальная концентрация нефтесодержащих отходов в смесях, в отношении которой рядом авторов показана высокая эффективность применения компостирования, выявлена на уровне 10-15 % от общей массы компостируемой смеси (O'Reilly, Simpkin, 1997; Juvonen *et al.*, 2000; Petrisor *et al.*, 2001). В отличие от вышеприведенных примеров, изучаемый процесс эффективнее при исходном содержании шлама на уровне 30 %.

Таблица 2

Динамика **ТОКСИКО-ХИМИЧЕСКИХ** показателей в процессе компостирования нефтехимического шлама

Варианты компостирования	Контроль (К)			Добавлено дизельное топливо (ДТ)			Добавлен отход производства лапрола (ОПЛ)		
	Месяц								
Параметры	0	3	16	0	3	16	0	3	16
Углеводороды нефти, г/кг (гравиметрически)	54.7	34.0	22.3	54.7	36.5	24.5	54.7	27.0	12.3
Углеводороды нефти, г/кг (ИК-спектроскопически)	79.2	40.2	10.1	79.2	37.5	11.0	79.2	33.6	10.2
Σ10 испыт. ПАУ, мг/кг	377.7	50.8	5.6	377.7	48.3	4.6	377.7	42,6	3.5
NH ₄ ⁺ , мгN/кг	200	35	17	200	125	22	200	32	8
NO ₃ ⁻ , мгN/кг	11.0	7.3	20.1	11.0	6.8	18.5	11.0	46.8	8.0
NO ₂ ⁻ , мгN/кг	6	1.5	0.3	6	2.4	0.9	6	2.1	0.3

Биоремедиационный процесс можно разделить на две фазы: 1 - активную (интенсивную), для которой характерна высокая скорость разложения контаминирующих агентов, и 2 - пассивную (экстенсивную), для которой отмечена низкая скорость деградации остаточных, в основном труднодоступных, компонентов нефтяного загрязнения (Harmsen et al., 1997; Smith et al., 1997). При компостировании нефтехимического шлама НКНХ интенсивной фазе процесса соответствует период первых 4 мес, а экстенсивной - с 5 по 16 мес. Ряд авторов указывают на трудности деструкции остаточного нефтяного загрязнения, связанные с уменьшением подвижности органических соединений (Harmsen et al., 1994, Loehr, Webster, 1997).

2.2. Динамики микробиологических показателей в процессе компостирования

Комплексный анализ микробиологических параметров выявил повышение числа органотрофной части микробного сообщества (аэробные гетеротрофы и ПАУ-деструкторы (нафталин, фенантрен, антрацен)) в период интенсивной фазы ремедиации, что можно рассматривать как ответ микроорганизмов нефтешлама на улучшения условий обитания (рис. 5). В первую очередь это касается уменьшения концентрации нефтяных углеводородов за счет повышения степени аэрации и уменьшения влажности вследствие смешивания шлама с отработанным наполнителем биофильтра, дозировки азота и фосфора в компостируемые смеси. В пользу активизации микробного сообщества **нефтешламовых** компостов может говорить тот факт, что в первый месяц обработки резко снижается содержание аммонийного азота - наиболее доступной минеральной формы этого биогенного элемента. То обстоятельство, что в компосте происходит повышение содержания нитратов, в сочетании с отсутствием увеличения содержания нитритов, дает основание предполагать, что в условиях компостирования функционируют бактерии, ответственные за нитрификацию как первой, так и второй фазы.

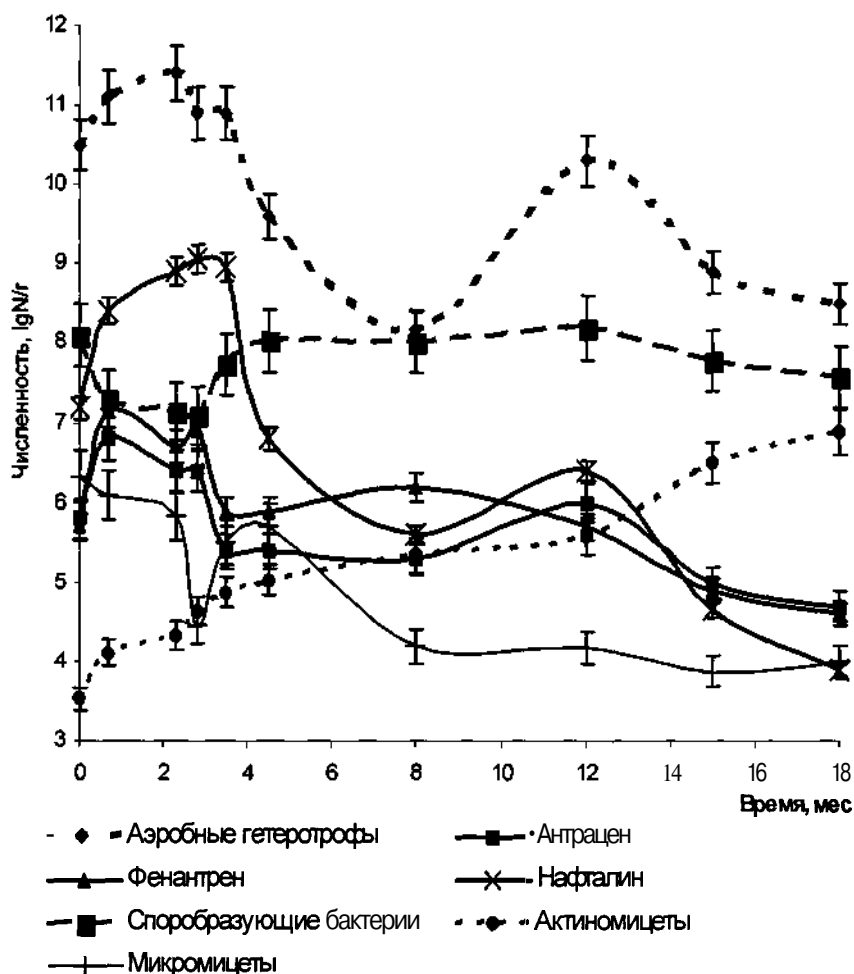


Рис.5. Динамика численности различных групп микроорганизмов (усредненная для трех вариантов) в процессе компостирования нефтешлама НКНХ.

Изучение микробной сукцессии в процессе компостирования нефтесодержащего отхода позволило выявить следующие закономерности.

В течение первого вегетационного сезона в первую очередь увеличивается численность микроорганизмов гетеротрофного блока бактерий, к которым принадлежат и деструкторы нефтяного загрязнения и его компонентов: нафталина, фенантрена, антрацена. Затем следует

умеренное увеличение численности **микробицетов** (рис. 5). Действительно, период активного разложения органического вещества характеризуется, в первую очередь, размножением неспорообразующих бактерий и развитием грибной микрофлоры (Мишустин, 1982).

Для завершающей стадии **ремедиации** (10-16 мес) наиболее показательно увеличение числа **актиномицетов**. Это объяснимо с позиции их экологической стратегии, в соответствии с которой, увеличение их количества наблюдается на последних этапах конвейерной переработки органического вещества, когда создаются условия для использования сравнительно труднодоступных субстратов (Зенова с соавт., 1996; Звягинцев, Зенова, 2001).

Сукцессия микроорганизмов при ремедиации **нефтешлама** идет по пути бактерии - грибы - **актиномицеты**. Сложившиеся соотношения групп микробного населения **компостов** по прошествии 16 мес испытаний свидетельствуют о наступлении устойчивого состояния в данной антропогенной экосистеме, которой, очевидно, отражает исчерпание основной, более доступной части органических загрязнений. Таким образом, динамика численности различных эколого-трофических групп в системе, созданной человеком, отражала в общих чертах картину характерную для естественной сукцессии природных экосистем (Мишустин, 1982).

2.3. Экоотоксикологическая оценка компостирования

Ремедиация экологически опасных и токсичных отходов должна непременно сопровождаться токсикологическим мониторингом (Aprill et al., 1990; Juvonen et al., 2000; Murphy et al., 2001) с включением тест-объектов, принадлежащих к различным трофическим уровням живых организмов.

Отсутствие токсического действия, и даже напротив, стимуляция роста бактериального штамма *Pseudomonas putida* (табл. 3) под воздействием проб компостов, отобранных практически на всем протяжении компостирования, является следствием высокого содержания доступного органического питания в компостируемых смесях и нечувствительности тест-объекта к токсичности используемого объекта. Аналогичный вывод был сделан при тестировании токсичности в процессе обезвреживания шлама нефтепереработки (Juvonen et al., 2000). Следует иметь ввиду, что отсутствие токсического действия водных экстрактов компостов на микроорганизмы, в том числе и собственную микрофлору шлама, не является показателем отсутствия токсичности компостов в отношении других объектов.

Динамика токсичности в процессе компостирования нефтешлама

Варианты компостирования	Контроль (К)			Добавлено дизельное топливо (ДТ)			Добавлен отход производства лапрола (ОПЛ)		
Параметры	Месяц								
	0	3	16	0	3	16	0	3	16
Токсичность по отношению к <i>P. putida</i> , % ингибирования	-20	-116	-5	-20	-121	-8	-20	-60	-4
Острая токсичность на <i>P. caudatum</i> , % смертности	15	33	0	15	19	0	15	20	0
Фитотоксичность, % ингибирования									
Пшеница	20	29	9	20	26	11	20	22	7
Редис	34	37	10	34	33	8	34	27	8

В период интенсивного разложения органических загрязнений (3 мес от начала испытаний) токсическое действие водного экстракта на одноклеточные и растения увеличивалось (табл. 3). Аналогичное повышение токсического потенциала обнаружено при ремедиации шламов нефтедобывающей (Aprill et al., 1990) и нефтеперерабатывающей промышленности (Juvonen et al., 2000). Повышение токсичности во время биоремедиации ПАУ-загрязненных почв может быть результатом неполной деградации загрязнений и формирования токсичных промежуточных метаболитов (Wang, Bartha, 1990; Phillips et al., 2000). Согласуется с данными литературы и временный характер повышения проявления токсичности (Juvonen et al., 2000).

Итоги компостирования нефтешлама подтверждают опыт других исследователей по детоксикации отходов с высокой исходной загрязненностью нефтяными компонентами, показывающий эффективность применения этого способа обработки с точки зрения токсикологических показателей (Juvonen et al., 2000). Однако, несмотря на отсутствие или резкое снижение негативного воздействия нефтешлама на различные группы живых организмов в конце испытаний (16 мес), в составе компостов сохраняются остаточные компоненты нефтяных углеводородов, в том числе принадлежащие к ПАУ, обладающие генотоксичностью. В этой связи наиболее верным является подход комплексного мониторинга объектов, подвергающихся обезвреживанию, как было предложено при выявлении токсикологических аспектов биоремедиации нефтезагрязненных почв (Murphy et al., 2001). К аналогичным выводам

пришли исследователи, изучающие процесс ремедиации почв с высокой контаминацией ПАУ (Phillips et al., 2000).

Снижение токсичности и стабилизация микробного сообщества коррелируют с уменьшением содержания углеводородов нефти. Наличие в компосте загрязняющих веществ на фоне отсутствия токсичности **свидетельствует** о стабилизации остаточного зафазнения. В результате ремедиации произошло сокращение содержания нефтяных углеводородов, в том числе ПАУ, при этом выявлено снижение токсического действия на простейшие и растения. Комплексный анализ компостируемых смесей показал эффективность применения данного метода биоремедиации для обезвреживания нефтехимического шлама **“Нижнекамскнефтехим”**, что позволило нам рекомендовать использование компостирования для полномасштабной биоремедиации твердого отхода нефтехимического промышленного комплекса.

ВЫВОДЫ

1. Высокое содержанием нефтяных (около 150 г/кг) и собственно нефтехимических (около 2 г/кг) компонентов в составе твердых отходов объединения **“Нижнекамскнефтехим” обуславливает** острую токсичность по отношению к простейшим (летальный эффект до 78%), **фитотоксичность** (ингибирование **нефтехламом** роста корней растений до 100%, водной вытяжкой до 59%) и мутагенность (кратность превышения числа ревертантов: водная вытяжка - до 15, органическая вытяжка — до 7).

2. Впервые выявлен факт высокой микробной **обсемененности** толщи **нефтехлама** (до 10^{10} клеток/г), на фоне тенденции к снижению показателей **численности** с глубиной залегания горизонтов шламакопителя. Наиболее характерной особенностью физиологического статуса микроорганизмов в многолетней массе нефтехимических отходов является высокая доля жизнеспособных форм (до 90% от общего количества микробных клеток). Важной особенностью большинства микроорганизмов, населяющих толщу нефтехлама, является их **гипометаболическое** состояние.

3. Микробиологический скрининг культивируемой части микробного сообщества показал, что нефтехлам является источником метаболически активной и **экстремотолернатной** микрофлоры, в том числе деструкторов труднодоступных ксенобиотиков, **осморезистентных**, психро- и термотолерантных микроорганизмов. Наличие адекватного метаболического потенциала и разносторонней устойчивости у нефтехламовой микрофлоры исключает необходимость интродукции специальных микробных препаратов в процессе ремедиации нефтехимических отходов.

4. Создана коллекция из 20 метаболически активных бактериальных штаммов, **способных метаболизировать** нефтяные компоненты, в том числе полициклические ароматические углеводороды. Эти штаммы могут быть использованы и уже используются для интенсификации **ремедиации** объектов.

5. Сукцессия микробного сообщества в процессе компостирования **нефтешлама** характеризовалась увеличением **органоτροφной** части микробиоценоза в первые месяцы компостирования, свидетельствующим о биодоступности, отражающем **биоразлагаемость** нефтяного загрязнения. Повышение числа **актиномицетов** (на 2 порядка) и стабилизация уровня органики на завершающем этапе созревания **компостов** свидетельствует об исчерпании в компостируемых смесях субстратов, способных удовлетворять потребности **копиотрофов** в источниках органического питания. В результате ремедиации микробиоценоз компостов нефтешлама приобрел свойства устойчивого сообщества на поздней стадии сукцессии.

6. Компостирование в **пилотно-полевых** условиях выявило его высокую эффективность для обезвреживания экологически опасных нефтехимических отходов. Об этом свидетельствует снижение суммарного уровня нефтяных углеводородов (на 70-80%, по данным гравиметрического метода, на 90% - с использованием **ИК-спектроскопии**), суммы 10 исследованных полициклических ароматических углеводородов - на 97%. Выявлено достоверное снижение негативного влияния компостов нефтешлама на тест-объекты из числа простейших (с 15 до 0%) и растений (с 34 до 7%).

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность зав. лабораторией очистки сточных вод **ОАО "Нижнекамскнефтехим"** к.б.н. Якушевой О.И. и всему коллективу лаборатории за постоянное внимание, консультации, участие в проведении химических анализов, предоставление **материально-технической** базы для выполнения совместных **опытно-полевых испытаний**.

Автор искренне благодарит к.б.н. Наумова А.В. за участие в экспериментах по компостированию нефтешлама и к.х.н. **Гарусова А.В. (НИЛ ЭББ КазГУ)** за помощь в проведении качественного и количественного анализа нефтяных углеводородов.

1. **Никитина Е.В.**, Якушева О.И., Зарипов С.А., Галиев Р.А., Гарусов А.В., Наумова Р.П. Особенности распределения и физиологического состояния микроорганизмов нефтешлама - отхода нефтехимического производства // **Микробиология**. - 2003. - Т.73, N.5. (в печати).
2. Якушева О.И., **Никитина Е.В.**, Частухина И.Б., Зарипов С.А., Суворова Е.С., Наумова Р.П. Микрофлора нефтешлама отхода нефтехимического производства // Вестник татарстанского отделения Российской экологической академии. - 2001. - № 1-2. - Р.45-50.
3. Якушева О.И., Никонорова В.Н., Кияненко Г.В., Качалина О.В., **Алиулова Р.А., Никитина Е.В.**, Наумова Р.П. Особенности химического состава нефтешлама - отхода нефтехимического производства // VI Международная конференция по интенсификации нефтехимических процессов "Нефтехимия-2002". Нижнекамск, Россия. - 2002. - С. 271-276.
4. Yakusheva O.I., **Nikitina E.V.**, Naumova R.P. **Bioremediation** and reuse of petrochemical sludge in JSC "Nizhnekamskneftekhim" // Papers from 7th International In-Situ and On-Site Bioremediation Symposium. - Florida, U.S.A. June 2-5, -2003, (presentation).
5. Зарипов С.А., Наумов А. В., **Никитина Е. В.**, Наумова Р. П. Альтернативные пути начальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами. // **Микробиология**. -2002. -Т.71, №5. - С.506-511.
6. Yakusheva O.I., **Nikitina E.V.**, Zariyov S. A., Naumov A.V., Suvorova E.S., Naumova R.P. Petrochemical waste sludge as a source of **metabolically** active and **extremotolerant** microorganisms. // 5th International symposium "Environmental contamination in Central and Eastern Europe " **Czech Republic**, Prague. - 1999. - P. 147.
7. Yakusheva O.I., **Nikitina E.V.**, Naumova R.P. **Microflora** of petrochemical oily sludge as the future potential for **bioremediation**// 6th International symposium "Environmental contamination in Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States" **Czech Republic**, Prague. - 2003. (in press).
8. **Никитина Е.В.**, Матвеева Е.А., Халиуллина М.А., Якушева О.И., Наумова Р.П. **Микробиология** твердых отходов нефтехимической промышленности // **Сборник тезисов** конференции "Биология - наука XXI века", 7-я **Пушкинская** школа-конференция молодых ученых. - 14-18 апреля 2003г. - С.286.

9. Никитина Е.В., Якушева О.И., Гарусов А.В., Наумова Р.П. Компостирование как способ обезвреживания отходов нефтехимического производства. // XV зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов. Москва. - 10-14 февраля, 2003. - С.57.

10. **Никитина Е.В.,** Матвеева Е.А., Галиев Р.А., Частухина И.Б., Якушева О.И., Наумова Р.П. Метаболическое разнообразие микроорганизмов – деструкторов нефтешлама // Сборник тезисов конференции "Биология - наука XXI века", 6-я Пущинская школа-конференция молодых ученых - 20-24 мая 2002г. - Т.3. - С.43.

11. Yakusheva O.I., Kharisova E.Z., Shurkhno R.A., Gareev R.G., **Nikitina E.V.,** Norina E. S., Naumova R.P. Bioremediation of petrochemical waste sludge by using of vermicomposting // 5th international conference "Environmental pollution – ICEP-2001", Volgograd-Perm, Russia. - 18-25 September, 2001. - P. 51.

12. **Nikitina E.V.,** Yakusheva O.I., Chastukhina I.B., Naumova R.P. Microorganisms of oil-contaminated waste as potential xenobiotics destructors // 5* conference of young scientist "Biology is science of 21st Century, Puschino, Russia. - 16-20 April 2001, - P.266.

13. Галухин В.А., Якушева О.И., Никонорова В.К., Гарифутдинова М.К., **Никитина Е.В.,** Наумова Р.П. Исследования по компостированию депонированных шламов ОАО "Нижнекамскнефтехим" // VI Международная конференция по интенсификации нефтехимических процессов "Нефтехимия-2002". Нижнекамск, Россия. - 2002. - С.276-277.

14. Якушева О.И., Зарипов С.А., **Никитина Е.В.,** Частухина И.Б., Суворова Е.С., Наумова Р.П. Нефтешлам как источник микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков // Тезисы докладов международной конференции "Экология и жизнь - 2000". - Великий Новгород, 2000. - С.2.